

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PRV

PATENT- OCH REGISTRERINGSVERKET
Patentavdelningen

097:147967

PCT/ SE 97/ 01003

1003

REC'D 30 JUL 1997

INFPD PCT



Intyg Certificate

Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.

(71) Sökande Pharmatrix AB, Sundbyberg SE
Applicant (s)

(21) Patentansökningsnummer 9602280-1
Patent application number

(86) Ingivningsdatum 1996-06-10
Date of filing

Stockholm, 1997-07-09

För Patent- och registreringsverket
For the Patent- and Registration Office


Hans Järvman

Avgift
Fee

PRIORITY DOCUMENT

PATENT- OCH
REGISTRERINGSVERKET
SWEDEN

Postadress/Adress
Box 5055
S 102 42 STOCKHOLM

Telefon/Phone
+46 8 782 25 00
Vx 08-782 25 00

Telex
17978
PATOREG S

Telefax
+46 8 666 02 86
08-666 02 86

IMMUNSTIMULERANDE LIPIDFORMULERING

BAKGRUND

Ett ökat antal specifika antigen från olika typer av organismer (ex tumörceller, bakterier, virus och parasiter) har producerats genom kloningstekniker under de senaste åren. Emellertid saknar dessa antigener oftast den nödvändiga immunogeniciteten trots mycket hög specificitet.

För att erhålla ett bra skydd vid vaccination behövs därför immunstimulerande system som kan förstärka och aktivera immunsystemet mot dessa svaga antigen. Dessa immunstimulerande system benämnes adjuvants.

Adjuvants, som f.n. användes nästan uteslutande i djurexperimentella studier, innefattar en mycket heterogen grupp av substanser; organiska substanser, oljemulsioner, laddade polymerer, neutrala substanser eller substanser från bakterier.

F.n. pågår omfattande forskning och utveckling för att om möjligt ta fram ett säkert adjuvant med hög effektivitet för användning på människa. Emellertid saknas idag fortfarande ett generellt adjuvant för detta ändamål.

Aluminiumhydroxid samt aluminiumfosfat - var de första organiska substanserna som användes som adjuvant på människa. Immunsvaret beror i detta fall delvis på en sakta desorption av det utfällda antigenet från ytan av partikeln. Senare visades att fagocyterande celler attraheras av dessa alum-salter som även detta förstärker immunsvaret. Emellertid är dessa alumsalter inte säkra adjuvant eftersom det har rapporterats granulombildning i samband med dess användning (Slater et al, Br.J.Dermatol., (1982) Vol. 107, sid. 103-108.). Vidare, så kan de ej användas vid alla typer av vaccination eftersom alla antigen ej kan adsorberas på ytan av partikeln.

1944 introducerade Freund sitt adjuvant som består av en blandning av olja, paraffin, detergenter samt avdödade bakterier. Förstärkningen av immunsvaret är även i detta fall delvis beroende av en sakta utsondring av antigenet från oljemulsionen. Friends adjuvant kan emellertid ej användas på människa pga granulombildning, inducering av auto-immuna reaktioner samt att mineraloljorna som användes kvarstannar under lång tid, åtminstone i djur. Dessutom är dess effekt svår att styra. Den aktiva substansen i Friends adjuvant har isolerats och strukturbestämts och visade sig vara N-acetyl muramyl-L- alaninisoglutamin, som även går under namnet muramyl-dipeptid (MDP).

Adjuvanteffekt avseende partikelstorlek av polymetakrylat- och polystyren-partiklar undersöktes på moss (Kreuter et al, Vaccine, (1986) vol 4, 125-129) genom att använda ovalbumin (som adsorberats till partikeln) som modellantigen och immunsvaret analyserades.

Partikelstorlekar varierades mellan 62 och 306 nm. Mindre partiklar gav bättre adjuvanteffekt. De små partiklarna gav bättre effekt än 0.2% Al(OH)₃. Alla preparationer gav bättre respons än flytande preparationer.

5 Generellt kan sägas att praktiskt taget samtliga idag använda och testade system för att öka den immunologiska aktiviteten mot antigen är i sig partiklar eller bildar partiklar tillsammans med antigenet. I boken "Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach" (Ed: Powell & Newman, Plenum Press, 1995) beskrivs ingående samtliga idag kända adjuvants både avseende deras immunologiska såväl som deras kemiska egenskaper. Man kan där utläsa att över 80% av idag använda adjuvants består i sig av partiklar eller av polymerer som tillsammans med antigen (oftast proteiner) bildar partiklar. De typer av adjuvants som ej i sig är partikelbildande är en grupp substanser som fungerar som immunologiska signalsubstanser och som under normala betingelser bildas efter administrering av partikulära adjuvantssystem.

10 Vid användandet av partikulära system som adjuvants associeras eller blandas ofta antigenet med eller i en matris som har den egenheten att den sakta skall brytas ner in vivo. Av stor betydelse vid arbete inom detta område är att matrisen vid nedbrytning ej bildar eller ger upphov till toxiska metaboliter. Vid val utifrån denna ståndpunkt blir man därvid huvudsakligen hänvisad till att använda matriser som är uppbyggda av kroppsegna substanser. Med denna bakgrund finns ett antal olika system att arbeta inom som uppfyller dessa krav: 15 mjölsyrapolymerer, polyaminosyror (proteiner), kolhydrater, lipider samt syntetiska polymerer som uppvisar biokompatibilitet och låg eller ingen toxicitet. Även kombinationer av dessa grupper av kroppsegna substanser eller kombinationer av kroppsegna substanser och biokompatibla substanser kan användas. Lipider är här att föredra eftersom de alla uppvisar 20 strukturer som gör att de är nedbrytbara in vivo samt ingår som den väsentligaste beståndsdelen i alla biologiska membran.

Lipider karakteriseras som polära eller icke-polära. De lipider som ofta är av vikt i denna uppfinnning är de polära enar de har förmåga att bilda partikulära system i vatten. Man brukar även definiera dessa typer av lipider som amfifila eftersom de har en hydrofob och en hydrofil 25 del i sin molekyl och därigenom kan fungera som ytaktiva substanser. Exempel på huvudgrupper av polära lipider är mono-glycerider, fettsyror, fosfolipider samt glycosingolipider. Dessa huvudgrupper kan i sin tur ytterligare karakteriseras beroende på acylkedjans antal kolatomer samt denna kolkedjas mattnadsgrad. Eftersom antalet kolatomer kan varieras mellan huvudsakligen 6 och 24 och antalet dubbelbindningar kan varieras mellan dessa kolatomer finns 30 ett nästan oändligt antal kombinationer på acylkedjans kemiska uppbyggnad.

De partikulära lipidsystemen i sin tur kan indelas efter de olika benämningar som diskuteras i den vetenskapliga litteraturen såsom liposomer, emulsioner, cubosomer, cochleates, miceller, etc.

35 I många system kan lipiderna i sig själva spontant bilda, eller formellt bilda, stabila system. Emellertid, under vissa förhållanden måste man tillföra andra ytaktiva substanser för att erhålla stabila system. Dessa ytaktiva substanser kan vara av icke-lipid karaktär men uppvisar denna typ av foreningars typiska egenskap att såsom de polära lipiderna ha en

hydrofob och en hydrofil del i sin molekylstruktur.

Ytterligare en faktor som har betydelse är att lipider uppvisar olika fysikal-kemiska faser, dessa faser har i olika testsystem visats ge ökat upptag av biologiskt aktiva substanser efter administrering till mucosan.

5 I den klassiska immunologin och i samband med vaccination mot olika typer av infektiösa agens, ex. bakterier, virus eller parasiter har den förhärskande dogmen varit att administrera vaccinet subkutant eller intramuskulärt. Emellertid har forskningen visat under de senaste åren att kroppen har ett mycket effektivt immunologiskt system vars effekt huvudsakligen finns i mucosan. Det har visats att man kan vaccinera genom att administrera vaccin oralt, nasalt, 10 rektalt eller vaginalt. På samma sätt som för de klassiska parenterala vaccinerna har visats att även vid mucosavaccinering finns behov att förstärka det immunologiska svaret genom att tillföra adjuvants.

På samma sätt som inom den klassiska immunologin där vacciner (antigener) administreras parenteralt, är det även inom mucosaimmunologin av stort intresse att kunde styra 15 immunsystemet mot utveckling av ett humoralt och/eller ett cellulärt svar. Om man erhåller ett humoralt svar skulle det vara väsentligt att kunna styra svaret så att en viss önskad antikroppsklass erhålles. För att eventuellt kunna nå detta mål kan specifika immunstimulerande substanser tillföras samtidigt som blandningen av antigen och adjuvant.

Olika typer av immunstimulerande substanser finns att utnyttja. Den ena typen är proteiner, 20 ex PHA, Con A, SEA eller olika typer av interferoner eller interleukiner. En annan typ av substans representeras av ovan nämnda MDP. Ytterligare grupper kan karakteriseras såsom lipiderivat eftersom de uppvisar molekylstrukturer som är amfifila. Ett exempel på sådan substans går under benämning MPL. En annan likartad substans är Quil A. Ytterligare en rad substanser av samma kategori finns beskrivna i boken "Vaccine Design - the subunit and adjuvant 25 approach" som diskuteras ovan.

Det skulle vara utomordentligt värdefullt att kunna effektivisera immuniserings-procedurerna och göra det möjligt att immunisera patienter, att kunna styra den till dominans av en viss antikroppsklass eller subklass samt att kunna inducera ett starkt T-cell svar mot antigenet.

30 Denna uppfinning behandlar lipider som blandade med ett antigen ökar immunsystemets aktivitet mot antigenen och därigenom kan fungera som adjuvants i olika vaccinerberedningar. I synnerhet innefattar uppfinningen användning av en formulering för vaccinering av mucosan som immunologiskt kan aktiveras genom nasal, oral, vaginal eller rectal administrering. Emellertid visar uppfinningen att det beskrivna lipidsystemet även fungerar utmärkt vid parenteral 35 administrering.

I den vetenskapliga litteraturen finns rapporterat hur man med hjälp av olika partikulära lipidsystem kan erhålla ett ökat upptag av en biologiskt aktiv substans efter administrering

5 till mucosan tillsammans med vissa lipider. Som ett exempel kan nämnas att Li & Mitra (Pharm.Res. vol 13:1, 1996) beskriver tillförsel av insulin till lungan blandat med olika fosfolipider i form av liposomer. De visar att effekten ffa är beroende på acylkedjans längd samt partikelns laddning. Optimal längd var ca 10 kolatomer och partikels laddning foretradesvis positiv. Även negativt laddade system fungerade bra medan neutrala system var

10 På likartat sätt har de Haan et al (Vaccine, 13:2, s. 155-162, 1995) blandat liposomer och antigenet hemagglutinin. Blandningen administrerades i näsan på råttor varefter ett positivt immunologiskt svar kunde detekteras. Gupta et al, (Vaccine, 14:3, 219-225, 1995) visar att endast en blandning av difteritoxoid tillsammans med ett icke fosfolipid baserat liposomsystem som administreras parenteralt till kaniner ger ett immunologiskt svar som motsvarar den befintliga produkten bestående av Alum-adsorberad difteritoxoid.

15 En hel rad vetenskapliga rapporter finns även redovisade där man erhåller goda immunologiska svar efter administrering av liposomer till mucosan där antigenen varit adsorberade eller inneslutna i liposomerna.

20 I en in vitro studie på en human cell linje från en coloncancer (Caco-2) visar Lindmark et al (J.Pharm.Exp.Ther. 275, 958-64, 1995) att bästa penetrerande effekt testat med modellsubstansen mannitol erhålles med en kolkedjängd av 10 kolatomer. I detta fall bestod lipiderna av saltet av rena fettsyror. Den så erhållna blandningen av dessa lipider tillsammans med vatten bildar miceller. Med utnyttjande av samma cellinje kan man även studera toxiciteten av beredningar. I ovanstående fall visade Lindmark att fettsyror med 12 kolatomer har en överlägsen förmåga att öka penetreringen av mannitol genom Caco-2 cellerna utan att uppvisa några synbara toxiska effekter. Den toxiska effekten avlastes i detta fall genom att studera Caco-2 cellerna via elektronmikroskopi. Ett annat sätt att avläsa toxicitet är att studera vissa enzyms funktion under påverkan av substanser som har för avsikt att öka penetreringen av biologiskt aktiva substanser, s.k. enhancers. Denna metod går allmänt under namnet MTT.

25 Liposomer består av fosfolipider och tillverkas genom en tamligen omständlig process som bl.a. innefattar organiska lösningsmedel. Dessutom betingar fosfolipider ett högt inköpspris. I nedanstående beskrivning av denna uppfinning visas att ett likartat immunologiskt svar kan 30 erhållas endast genom att blanda antigen med en lipidformulering som innehåller mindre komplicerade lipider som betingar ett väsentligt lägre pris samt kan tillverkas i kommersiell skala på ett mycket enkelt sätt.

35 Denna uppfinning visar att endast blandning av antigen tillsammans med adekvata lipider har förmåga att stimulera kroppen att bilda ett skyddande immunsvär. Ytterligare en fördel som denna enkla metod för med sig jämfört med inneslutningsmetoder är att inget material (antigen) går förlorat i processen. Som exempel kan nämnas att vid inneslutning av antigen i liposomer erhålles normalt 10-20% utbyte av antigen. Resten förloras i processen.

Litteraturuppgifterna ovan visar att man genom att endast blanda liposomer och antigen kan erhålla ett immunologiskt svar efter administrering till mucosan.

Emellertid visar exemplen i denna uppfinning att systemet kan göras kommersiellt annu mer tilltalande genom att använda lipider som är stabilare, billigare och som på ett mycket enklare sätt kan formuleras till ett partikulärt system.

Uppfinningen exemplifieras genom några exempel som visar att principen att administrera ett antigen i kombination med det beskriva lipidsystemet fungerar som ett adjuvant.

Exempel 1.

En suspension av monoolein tillverkades genom att tillföra 3 g monoolein till 50 ml 0,6% Pluronic 127 lösning i PBS varefter blandningen sonikerades med en probesonikator (Branson) under 4 minuter. Den erhållna mjölkvita suspensionen består av partiklar med en maximal storlek av ca 2 µm.

Exempel 2.

En negativt laddad micellsuspension av monoolein tillverkades genom att blanda 0,5 g oljesyra till 5 ml 0,35 M NaOH och sonikera med en probesonikator under ca 5 sekunder. Därefter tillfördes 3 g monoolein och 50 ml PBS varefter blandningen sonikerades med en probesonikator (Branson) under 4 minuter varefter pH justerades till mellan 8 och 9 med 0,35 M NaOH. Den erhållna helt genomskinliga och glasklara suspensionen består av partiklar med en maximal storlek av ca 0,2 µm.

Exempel 3.

En positivt laddad micellsuspension av monoolein tillverkades genom att blanda 0,5 g laurylamin till 3,5 ml 0,5 M HCl och sonikera med en probesonikator under ca 5 sekunder. Därefter tillfördes 3 g monoolein och 50 ml vatten varefter blandningen sonikerades med en probesonikator (Branson) under 4 minuter varefter pH justerades till mellan 4 och 5 med 0,5 M HCl. Den erhållna helt genomskinliga och glasklara suspensionen består av partiklar med en maximal storlek av ca 0,2 µm.

Exempel 4.

En blandning mellan monoolein, Pluronic och difteritoxoid tillverkade enligt exempel 1, gavs subkutant till moss med efterföljande subkutan booster efter 21 dagar. Efter 30 dagar togs blodprover som analyserades avseende IgG-antikroppar mot difteritoxin samt analys av skyddande antikroppar genom en s.k. Verocell analys. Resultatet visade att både IgG och skyddande antikroppstitrar befann sig på samma nivå som hos kontrolldjuren som fick den

befintliga produkten bestående av difteritoxoid adsorberat på aluminiumfosfat.

Exempel 5.

5 Samma som Exempel 4 med skillnaden att boostern gavs nasalt i stället för subkutan. Även här visade resultatet avseende IgG samt skyddande antikroppar att de erhållna titrarna var på samma nivå som den befintliga produkten.

Exempel 6.

10 Samma som Exempel 4, med skillnaden att båda administreringarna gavs nasalt samt att rCTB tillfördes blandningen. Även här visade resultatet avseende IgG antikroppar att de erhållna titrarna var på samma nivå som den befintliga produkten.

Exempel 7.

15 En blandning mellan monoolein och oljesyra i form av en micellsuspension blandades med difteritoxoid och rCTB och gavs nasalt till möss med nasal booster efter 21 dagar. Efter 30 dagar togs blodprover som analyserades avseende IgG-antikroppar mot difteritoxin. Resultatet visade att IgG antikroppstitrar befann sig på samma nivå jämfört med kontroldjuren som fick den befintliga produkten bestående av difteritoxoid adsorberat på Aluminiumfosfat.

Exempel 8.

20 För att utvärdera toxiciteten av de framställda lipidformuleringarna administrerades dessa i näsan på råttor varefter vid olika tidpunkter råttorna avlivades och den nasala slemhinnan fripreparerades. Preparaten granskades efter färgning med hjälp av ljus- och fluorescensmikroskopi samt med svepelektronmikroskopi (SEM). Endast monoolein/pluronic suspensionen uppvisade lättare förändringar av cilier synbara i SEM. Inga toxiska effekter kunde observeras vid den ljus- eller fluorescensmikroskopiska undersökningen.

Exempel 9.

30 Caco-2 celler, som är en human cellinje (coloncancer) som växer ut som ett monolager av epitelliknande celler. Den användes mycket frekvent för att utvärdera olika substansers förmåga att påverka transport av biologiskt aktiva substanser genom epitelceller och har i ett antal experimentella system visat sig ge mycket god korrelation till in vivo data avseende upptag från tarmen. Som markör av transport genom cellerna användes Na-fluorescein och mannitol. Experimenten visade att lipidformuleringarna ger en ökning av transporten genom cellerna vid icke toxiska koncentrationer vilka bestämdes genom den s.k. MTT metoden.

PATENTKRAV

- 5 1. Immunstimulerande system, kännetecknat av, att antigener är blandade med ett partikulärt lipidsystem.
2. Immunstimulerande system enligt krav 1, kännetecknat av, att det partikulära lipidsystemet består av en eller flera polara lipider i en vattentas.
- 10 3. Immunstimulerande system enligt krav 2, kännetecknat av, att de polara lipiderna kommer ur någon av grupperna monoglycerider, fettsyror, eller derivat av dessa.
- 15 4. Immunstimulerande system enligt krav 1, kännetecknat av, att det partikulära lipidsystemet består av en blandning av en eller flera polara lipider samt en eller flera ytaktiva substanser i en vattentas.
5. Immunstimulerande system enligt krav 1-4, kännetecknat av, att till det partikulära lipidsystemet har tillförts ytterligare immunologiskt stimulerande substans.

SAMMANFATTNING

- 5 Ett immunstimulerande system beskrives, vari antigener och immunstimulerande substanser blandas med ett lipidsystem, som vid in vivo anvandning ger ett forstarkt immunsvar mot antigenet.

1997-11-11

1997-11-11

THIS PAGE BLANK (USPTO)